

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/88144 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04158

(22) 国際出願日: 2001 年 5 月 18 日 (18.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-148726 2000 年 5 月 19 日 (19.05.2000) JP
特願2000-396955 2000 年 12 月 27 日 (27.12.2000) JP
特願2001-16929 2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横溝 聡

(YOKOMIZO, Satoru) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6丁目31-17 三青荘 Hyogo (JP). 福地 健 (FUKUCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒673-0866 兵庫県明石市朝霧町3-123 セゾン朝霧304 Hyogo (JP). 小坂田史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県岡山市大安寺東町17-7 Okayama (JP). 松本圭司 (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県西宮市大森町11-33 Hyogo (JP). 高木正道 (TAKAGI, Masamichi) [JP/JP]; 〒183-0051 東京都府中市栄町1丁目31-10 Tokyo (JP). 太田明徳 (OHTA, Akinori) [JP/JP]; 〒331-0063 埼玉県さいたま市ブラザ57-2 Saitama (JP).

(74) 代理人: 安富康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, ID, JP, KR, SG, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: TRANSFORMANT AND PROCESS FOR PRODUCING POLYESTER BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

(57) Abstract: A gene encoding copolymerized polyester synthase; a microorganism synthesizing polyester via fermentation with the use of the above gene; and a process for producing polyester by using the above microorganism. More particularly speaking, a gene acting in a host wherein a plastic-like polymer which is degradable by microorganisms in natural environment (soil, river, ocean) can be enzymatically synthesized; a transformant having an improved ability to synthesize a plastic-like polymer by fermentation which is obtained by transforming the above gene; and a process for producing copolymerized polyester by using the above transformant.

(57) 要約:

本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の酵素合成が可能な宿主内で機能する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。



WO 01/88144 A1

明細書

形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

技術分野

- 5 本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、宿主内で機能し、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を酵素合成する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵
10 合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。

背景技術

- 現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステル
15 を菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）であり、1925年にバシラス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）で最初に発見された。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしい
20 グリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

- その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）
25 とからなる共重合体（以下P（3HB-co-3HV）と略す）の製造方法が開示されている。このP（3HB-co-3HV）はP（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP（3HB-co-3HV）は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上

otechnol. 49, 333 (1998))。また、大腸菌等の細菌や植物を宿主としたP(3HB-co-3HH)の製造方法も開示されている(WO 00/43525)。しかし、本製造法による生産性は記載されていない。

本ポリマーP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法では本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

10 最近になって、3HBの前駆物質であるアセチルCoAを効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステルの生産研究がLeafらによって行われた(Microbiology, vol. 142, pp1169-1180 (1996))。酵母の一種であるサッカロマイセス・セルビシエ(Saccharomyces cerevisiae)にラルストニア・ユートロファのポリエステル合成酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP(3HB)の蓄積(ポリマー含量0.5%)を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有するP(3HB)であった。

20 酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。酵母菌体は過去Single Cell Proteinとして注目され、ノルマルパラフィンを炭素源とした飼料用菌体生産が研究されたり、調味料としてその核酸成分が利用されてきた。また、ポリマーの前駆物質であるacetyl-CoAを効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

発明の開示

本発明は、上記現状に鑑み、酵母で機能的かつ効率よく発現できるポリエステ

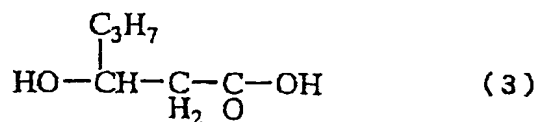
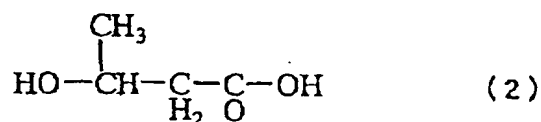
に關与する酵素遺伝子にも關する。

以下に、本發明の詳細を説明する。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、実施例2(a)においてベクターとして使用したプラスミドpSUT5を示す模式図である。
- 図2は、実施例2(b)においてベクターとして使用したプラスミドpUTA1を示す模式図である。
- 10 図3は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-phaJを示す模式図である。
- 図4は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-PHA1を示す模式図である。
- 図5は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-PHA2を示す模式図である。
- 15 図6は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL1を示す模式図である。
- 図7は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL-ORF2を示す模式図である。
- 図8は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL-ORF3を示す
- 20 模式図である。
- 図9は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUTA-ORF23を示す模式図である。
- 図10は、実施例2(a)のプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。
- 25 図11は、実施例2(b)プラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。
- 図12は、実施例3において製造されたポリエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した結果である。
- 図13は、実施例3において製造されたポリエステルのNMR分析のチャート

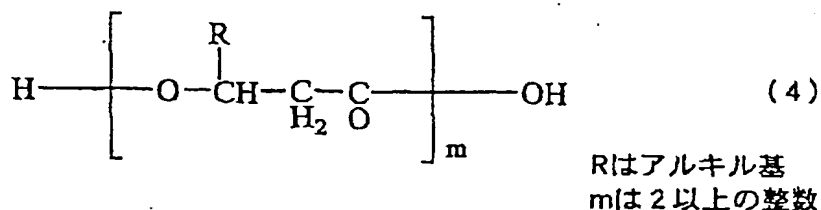
ラ属 (Guilliermondella 属), ハンセニアスポラ属 (Hanseniaspora 属), ハンセヌラ属 (Hansenula 属), ハセガワエ
ア属 (Hasegawaea 属), ホルターマンニア属 (Holtermannia 属), ホルモアスカス属 (Hormoascus 属), ハイフォビキア属 (5
Hyphopichia 属), イサットヘンキア属 (Issatchenkia 属), クロエケラ属 (Kloeckera 属), クロエケラスポラ属 (Kloeckeraspora 属), クルイベロマイセス属 (Kluyveromyces 属), コンドア属 (Kondoa 属), クライシア属 (Kuraishia 属), クルツマノマイセス属 (Kurtzmanomyces 属), ロイコスポリ
10 ディウム属 (Leucosporidium 属), リポマイセス属 (Lipomyces 属), ロデロマイセス属 (Lodderomyces 属), マラセジア属 (Malassezia 属), メトシュニコウイア属 (Metschnikowia 属), ムラキア属 (Mrakia 属), マイクソザイマ属 (Myxozyma 属), ナドソニア属 (Nadsonia 属), ナカザワエア属 (Nakazawaea 属), ネマトスポラ属 (Nematospora 属), オガタエア
15 属 (Ogataea 属), オースポリディウム属 (Oosporidium 属), パチソレン属 (Pachysolen 属), ファチコスポラ属 (Phachytichospora 属), ファフィア属 (Phaffia 属), ピキア属 (Pichia 属), ロドスポリディウム属 (Rhodosporidium 属),
20 ロドトルラ属 (Rhodotorula 属), サッカロマイセス属 (Saccharomyces 属), サッカロマイコーデス属 (Saccharomycodes 属), サッカロマイコプシス属 (Saccharomycopsis 属), サイトエラ属 (Saitoella 属), サカグチア属 (Sakaguchia 属), サターノスポラ属 (Saturnospora 属), シゾブラストスポ
25 リオン属 (Schizoblastosporion 属), シゾサッカロマイセス属 (Schizosaccharomyces 属), シュワニオマイセス属 (Schwanniomyces 属), スポリディオボラス属 (Sporidibolus 属), スポロボロマイセス属 (Sporobolomyces 属), スポロパキデミア属 (Sporopachydermia 属), ステファノアス



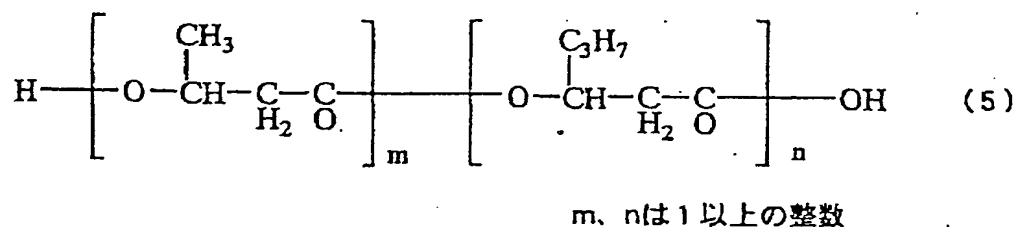
上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアリカン酸を共重合してなるポリ
 エステルの合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平 1
 5 0-108682 号公報に記載されているポリエステル合成酵素遺伝子を用いる
 ことができる。上記ポリエステル合成酵素遺伝子としては、例えば、PHA 合成
 酵素遺伝子があげられる。また、本ポリエステル合成酵素遺伝子と共にポリエス
 テル合成に関与する酵素遺伝子を用いても良い。これらの酵素遺伝子としては、
 たとえば、 β 酸化経路の中間体のエノイル CoA をモノマーである (R)-3-
 10 ヒドロキシアシル CoA に変換する (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ
 遺伝子 (T. Fukui, et al FEMS Microbiology L
 etters, vol. 170, 69-75 (1999)) や、アセチル C
 oA を二量化してモノマーである 3-ヒドロキシブチリル CoA を合成する β ケ
 トチオラーゼ遺伝子、NADPH 依存性アセトアセチル CoA 還元酵素遺伝子 (
 15 Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26)
 15298-15303 (1989)) などが挙げられる。

上記宿主酵母の中には遺伝暗号読みとり異常を示す場合がある。例えばキャ
 ンディダ・シリンドラセア (Candida cylindracea) (Y.
 Kawaguchi et al, Nature 341 164-166 (1
 20 989)) やキャンディダ・マルトーサ (H. Sugiyama et al,
 Yeast 11 43-52 (1995)) では遺伝暗号 CTG が、ロイシン
 ではなくセリンに翻訳される特殊な酵母である。このような酵母では、ポリエス
 テル合成に関与する酵素遺伝子を発現させる場合、遺伝暗号の読みとり異常が生
 じることから、当該酵素のアミノ酸配列の異なった酵素が生産されることがある
 25 。その結果、当該酵素の機能が十分発揮できない。

般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。



5



(3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の5'上流にプロモーター、UAS等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結が必要である。これらのDNA配列は酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターは、ポリエステル生産に使用する生物において機能するものであるものが好ましい。

以下、本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセット構築の例として、

(a) 宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合、(b) 宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合について具体的に説明する。

20

(a) 宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合

配列番号14に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いてもよい。

プロモーター部分は配列番号5を鋳型にして配列番号8と配列番号9、配列番号9と配列番号10を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sを作製することができる。phaCは配列番号1を鋳型にして配列番号11と配列番号12とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がPstIである約100bpの断片を作製することができる。これに残りのPstI—BamHI約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaCを作製することができる。phaJは配列番号2を鋳型にして配列番号13と配列番号14とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がKpnIであるphaJを作製することができる。ベクターにはプラスミドpSUT5（図1、配列番号19）とpSUT5のNdeIサイトを配列番号20のリンカーDNAを用いて、XbaIサイトに変更したベクターpSUT6とを使用することができる。pSUT6のマルチクロニングサイトのSacII、KpnIサイトにALK3SとphaJとを結合し、プラスミドpSUT—phaJ（図3）を構築することができる。次にpSUT5のマルチクロニングサイトのXbaI、BamHIサイトにALK3XとphaCとを結合し、プラスミドpSUT—PHA1（図4）を構築することができる。

さらにプラスミドpSUT—phaJからSacIIとXbaIとを用いて、ALK3SとphaJと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、プラスミドpSUT—PHA1のSacII、XbaIサイトに結合したプラスミドpSUT—PHA2（図5）の二種類の組換え用プラスミドを構築することができる。

以上の方法により、酵母ヤロウィア・リポリティカにおいて上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

（b）宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合

は配列番号15から配列番号18に示す。PCRの条件は(a)で上述した条件を用いることができる。

プロモーター部分は配列番号6を鋳型にして配列番号15と配列番号16を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製することができる。ターミネーター部分は配列番号7を鋳型にして配列番号17と配列番号18を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製することができる。ベクターにはpUTU1とキャンディダ・マルトーサのAde1遺伝子(配列番号21、GenBank D00855)(S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991))を用いて、マーカー遺伝子をUra3からAde1に変更したベクターpUTA1(図2)を使用することができる。pUCNT(WO 94/03613に記載)のPvuII、NdeIサイトにALK1pを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1(図6)を構築することができる。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2(図7)を構築することができる。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3(図8)を構築することができる。

つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築することができる。

さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図9)を構築することができる。

以上の方法により、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式(1)で示されるアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

- 5 炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュクロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。例えば、キャン
- 10 ディダ・マルトーサの培養及びヤロウィア・リポリティカの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油
- 15 脂資化能を付与することもできる。

また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸やn-パラフィン等を用いた場合、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

- 窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、
- 20 リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

- その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン
- 25 、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロ

来のPHA合成酵素と、 β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである
(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoA
ヒドラターゼ(T. Fukui, et al. FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))のアミ
5 ノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。

キャンディダ・マルトーサはCTGコドンをロイシンではなくセリンに翻訳す
る酵母である。このため、キャンディダ・マルトーサにおいて使用するにあたり
、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。各アミノ酸に対応するコドン
はキャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択し
10 た。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版
)を参考にした。具体的には、メチオニン、トリプトファンは、それぞれをAT
G、TGGを割り当てた。フェニルアラニンでは、TTTとTTCを交互に割り
当てた。ロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるCTCをT
15 TA、CTGをTTGにそれぞれ変換し、TTAとTTGはそのまま用いた。イ
ソロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるATCをATT、
ATAをATCにそれぞれ変換し、ATTはそのまま用いた。バリンでは、アエ
ロモナス・キャビエDNA配列におけるGTGをGTT、GTAをGTTにそれ
ぞれ変換し、GTCとGTTはそのまま用いた。セリンでは、アエロモナス・キ
20 ャビエDNA配列におけるAGCをTCT、TCAをTCT、TCGをTCTに
それぞれ変換し、TCCとTCTはそのまま用いた。プロリンでは、対応するコ
ドンを全てCCAに変換した。スレオニンでは、アエロモナス・キャビエDNA
配列におけるACCをACT、ACGをACC、ACAをACCにそれぞれ変換
し、ATCはそのまま用いた。アラニンでは、アエロモナス・キャビエDNA配
25 列におけるGCCをGCT、GCGをGCC、GCAをGCTにそれぞれ変換し
、GCTはそのまま用いた。チロシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列
におけるチロシンコドンに対して、TAT、TACを交互に割り当てた。終始コ
ドンは、TAAを用いた。ヒスチジンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列
におけるヒスチジンコドンに対して、CAT、CACを交互に割り当てた。グル

た。これに残りのPstI-BamHI断片約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaCを作製した。phaJは配列番号2を鋳型にして配列番号13と配列番号14とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がKpnIであるphaJを作製した。

- 5 ベクターにはプラスミドpSUT5 (図1、配列番号19) とpSUT5のNdeIサイトを配列番号20のリンカーDNAを用いて、XbaIサイトに変更したベクターpSUT6とを使用した。pSUT6のマルチクローニングサイトのSacII、KpnIサイトにALK3SとphaJjとを結合し、プラスミドpSUT-phaJ (図3) を構築した。次にpSUT5のマルチクローニングサイトのXbaI、BamHIサイトにALK3XとphaCとを結合し、プラスミドpSUT-PHA1 (図4) を構築することができる。
- 10

- さらにプラスミドpSUT-phaJからSacIIとXbaIとを用いて、ALK3SとphaJと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、同DNAをプラスミドpSUT-PHA1のSacII、XbaIサイトに挿入することによりプラスミドpSUT-PHA2 (図5) を構築した。すなわち、このようにして二種類の組換え用プラスミドpSUT-PHA1とpSUT-PHA2を構築した。以上の方法により、酵母ヤロウィア・リボリティカにおいて上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図を図10に示した。
- 15
- 20

- 宿主にはヤロウィア・リボリティカCXAU1株 (T. Iida, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998)) を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast Track™-Yeast Transformation Kit_{SM} (Geno Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.67w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid、2w/v% グルコース、24mg/L アデニン塩酸塩、2w/v% 寒天) を使用して組換え株を取得した。
- 25

2 (播州調味料)、0.04 w/v % アデニン、1 ppm チアミン塩酸塩、1 v/v % 微量金属塩溶液 (0.1 N 塩酸に 8 w/v % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 w/v % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.9 w/v % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 w/v % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 w/v % $\text{MnSO}_4 \cdot 6-7\text{H}_2\text{O}$ 、1 w/v % NaCl)) にパーム油を 2 w/v % を添加したものを使用した。

各組換え株のグリセロールストック 100 μl を 100 ml の前培地が入った 500 ml 坂口フラスコに接種して 20 時間培養し、500 mL の生産培地を入れた 2 L 坂口フラスコに 1 v/v % 接種した。これを培養温度 30℃、振盪速度 120 rpm、培養時間は、YPD 培地で 24 時間、ミネラル培地で 72 時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを 100 ml 添加し一晚攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで 1-2 ml にまで濃縮し、濃縮液に 10 ml のヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

得られたヘキサン不溶物約 2 mg に 500 μl の硫酸-メタノール混液 (15 : 85) と 500 μl のクロロホルムとを添加して密栓し、100℃で 140 分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに 0.3 g の炭酸水素ナトリウムを添加し、中和した。これに 1 ml のジイソプロピルエーテルを添加して攪拌機を用いて攪拌した。遠心分離して有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所 GC-17A、キャピラリーカラムは GL サイエンス社製 NEUTRA BOND-1 (カラム長 25 m、カラム内径 0.25 mm、液膜厚 0.4 μm) を用いた。温度条件は、初発温度 100℃から 8℃/分の速度で昇温した。得られた分析結果を表 1 に、またその時のサンプル (3) のチャートを図 12 に示す。また、得られたヘキサン不溶物の NMR 分析 (JEOL、JNM-EX400)、IR 分析 (島津製作所、D

出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで1-2mlにまで濃縮し、濃縮液に10mlのヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

その結果、プラスミドpUTA-ORF23を導入した組換え株をヤシ油、テトラデカン、ヘキサデカンで培養したものに白色沈殿が見られた(表2)。ヤシ油で培養したときに得られたヘキサン不溶物のNMR分析(JEOL、JNM-EX400)の結果を表2、図15に示す。

表2 組換え株培養結果

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマーの蓄積
パーム油	12.5	—
ヤシ油	10.3	++
テトラデカン	4.4	+
ヘキサデカン	3.6	+

この結果から、酵母キャンディダ・マルトーサを用いて共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)が生産できることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母を用いて生産することが可能となった。

ドマイコブセラ属, エレマスカス属, エレモセシウム属, エリスロバシディウム属, フェロマイセス属, フィロバシディウム属, ガラクトマイセス属, ゲオトリクム属, ガイラーモンデラ属, ハンセニアスポラ属, ハンセヌラ属, ハセガワエア属, ホルターマンニア属, ホルモアスカス属, ハイフォピキア属, イサット
5 ヘンキア属, クロエケラ属, クロエケラスポラ属, クルイペロマイセス属, コン
ドア属, クライシア属, クルツマノマイセス属, ロイコスポリディウム属, リボ
マイセス属, ロデロマイセス属, マラセジア属, メトシュニコウエア属, ムラキ
ア属, マイクソザイマ属, ナドソニア属, ナカザワエア属, ネマトスポラ属, オ
ガタエア属, オースポリディウム属, パチソレン属, ファチコスポラ属, ファフ
10 イア属, ピキア属, ロドスポリディウム属, ロドトルラ属, サッカロマイセス属,
サッカロマイコーデス属, サッカロマイコブシス属, サイトエラ属, サカグチ
ア属, サターノスポラ属, シゾブラストスポリオン属, シゾサッカロマイセス属,
シュワニオマイセス属, スポリディオボラス属, スポロボロマイセス属, スポ
ロバキデミア属, ステファノアスカス属, ステリグマトマイセス属, ステリグ
15 マトスポリディウム属, シンビオタフリナ属, シンポディオマイセス属, シンポ
ディオマイコブシス属, トルラスポラ属, トリコスポリエラ属, トリコスポロン
属, トリゴノブシス属, ツチャエア属, ウデニオマイセス属, ワルトマイセス属,
ウィカーハミア属, ウィカーハミエラ属, ウィリオブシス属, ヤマダザイマ属,
ヤロウエア属, ザイゴアスカス属, ザイゴサッカロマイセス属, ザイゴウィリオ
20 ブシス属又はザイゴザイマ属である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の形質転
換体。

5. 酵母がヤロウエア・リポリティカである請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

25

6. 酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項 1～4 記載のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

7. ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが、酵母で機能す

16. 前記 PHA 合成酵素遺伝子は配列番号 3 に示す塩基配列からなり、(R) 体特異的エノイル C o A ヒドラターゼ遺伝子は配列番号 4 に示す塩基配列からなる請求項 15 に記載の形質転換体。

5 17. 請求項 1 ~ 16 記載のいずれか 1 項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

18. 遺伝暗号 CTG の少なくとも 1 つが、TTA、TTG、CTT、CTC、
10 又は CTA に変換されていることを特徴とするポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

19. 細菌由来の酵素をコードする請求項 18 記載のポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

15

20. 前記細菌がアエロモナス・キャピエ (*Aeromonas caviae*) である請求項 19 記載のポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

21. アエロモナス・キャピエ由来の酵素遺伝子が PHA 合成酵素遺伝子又は
20 (R) 体特異的エノイル C o A ヒドラターゼ遺伝子である請求項 20 に記載のポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

22. 前記 PHA 合成酵素遺伝子が配列番号 3 に示す塩基配列からなる請求項 21 に記載のポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

25

23. 前記 (R) 体特異的エノイル C o A ヒドラターゼ遺伝子が配列番号 4 に示す塩基配列からなる請求項 21 に記載のポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子。

2/11

図 3

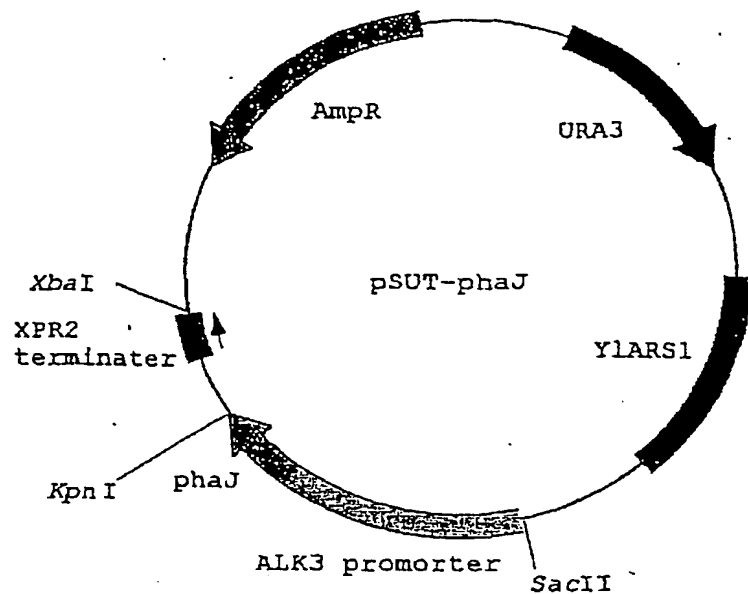
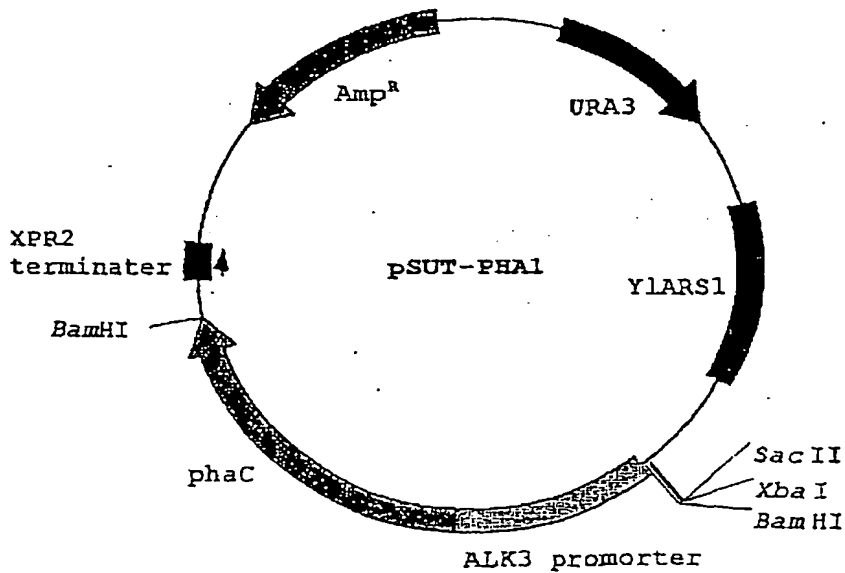
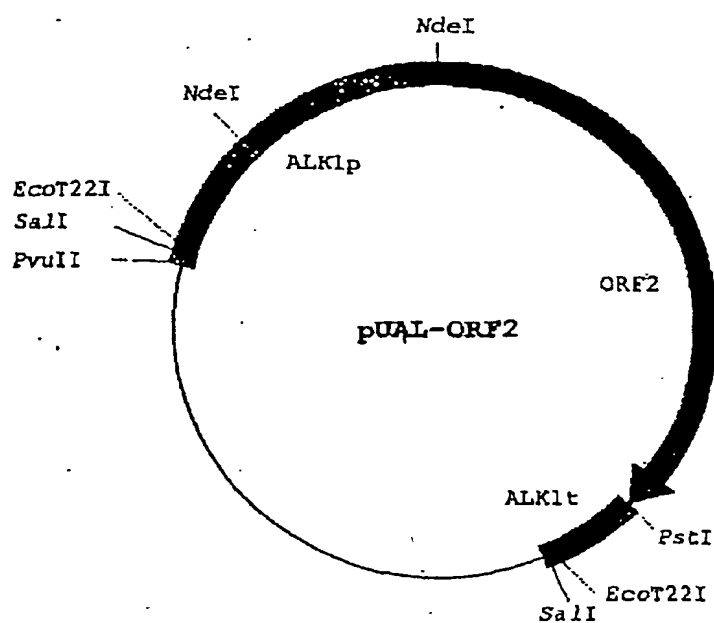


図 4



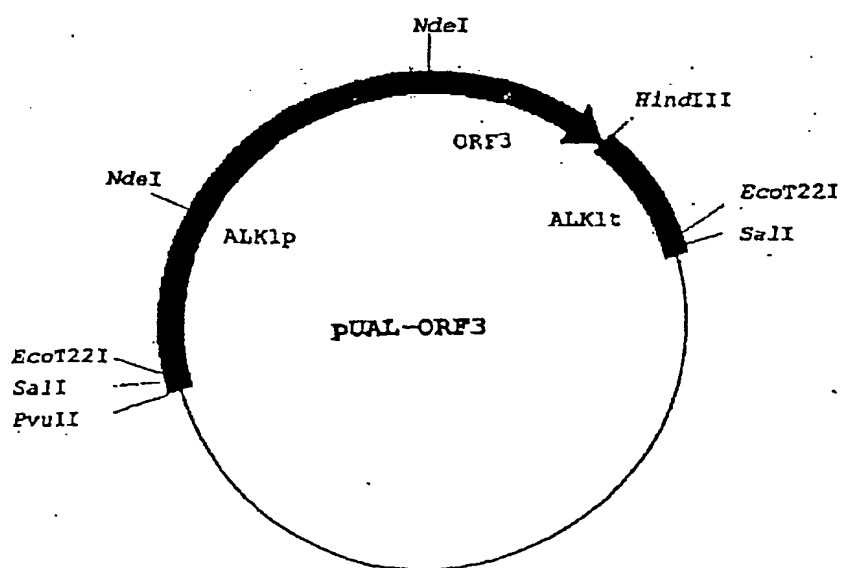
4/11

図 7



pUAL-ORF2

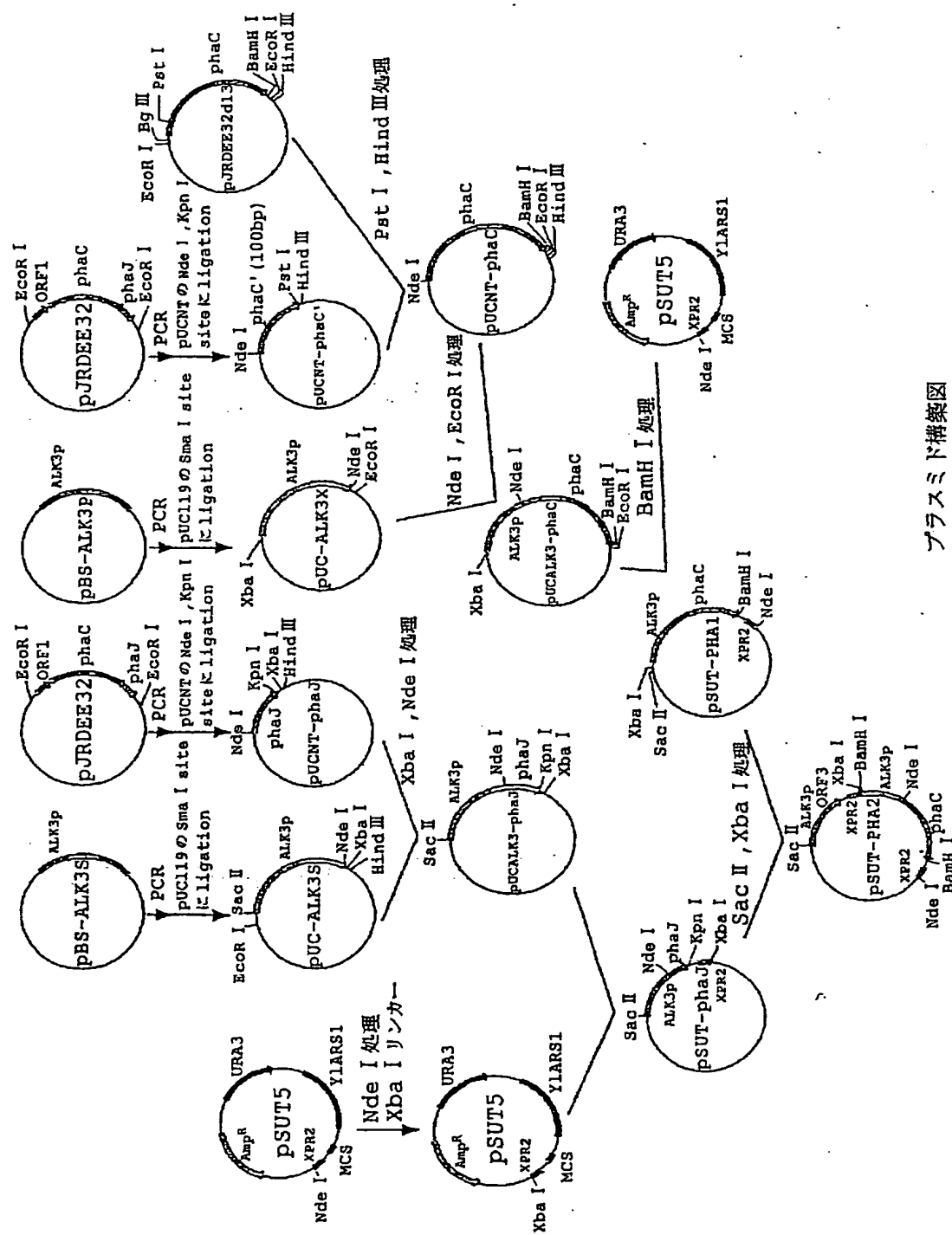
図 8



pUAL-ORF3

6/11

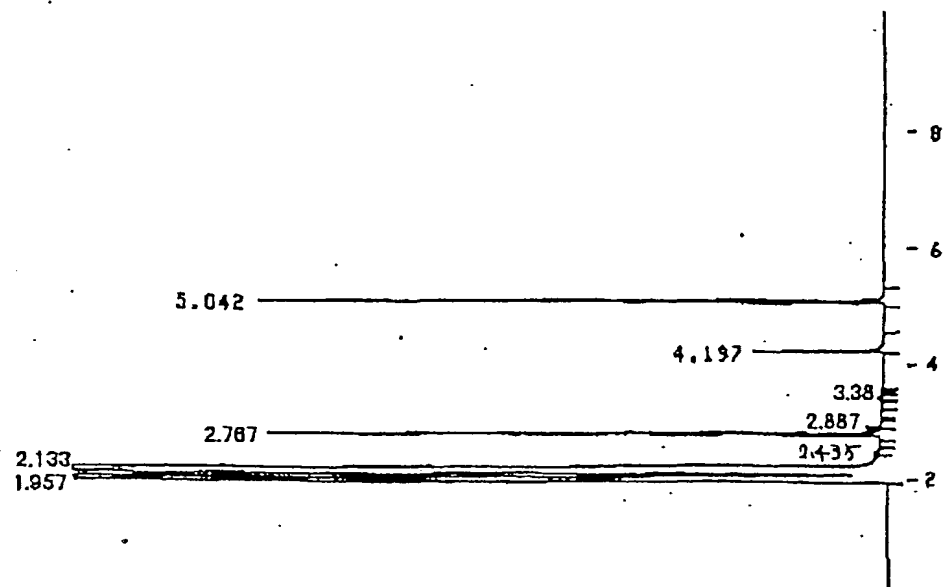
図 10



プラスミド構築図

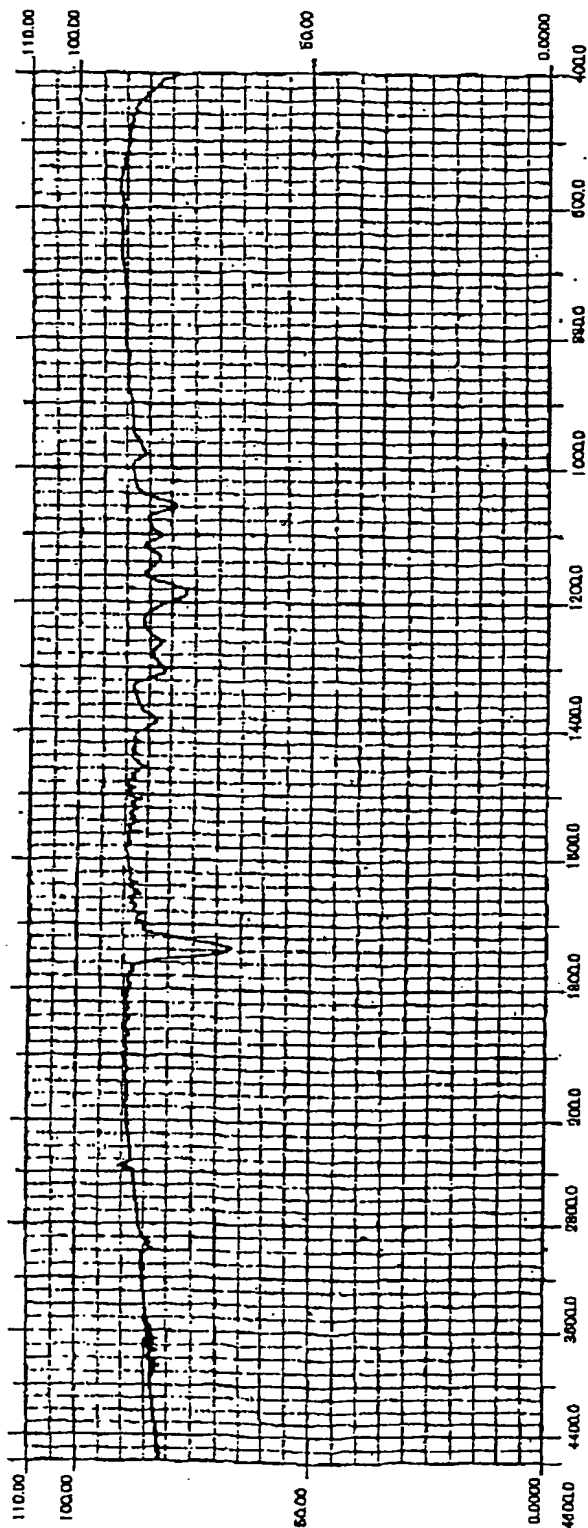
8/11

図 1 2



10/11

図 14



1/18

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANAKA CORPORATION

<120> 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

<130> T-618

<160> 21

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> *Aeromonas caviae*

<220>

<221> CDS

<222> 1..1785

<400> 1

```
atg agc caa cca tct tat ggc ccg ctg ttc gag gcc ctg gcc cac tac    48
aat gac aag ctg ctg gcc atg gcc aag gcc cag aca gag cgc acc gcc    96
cag gcg ctg ctg cag acc aat ctg gac gat ctg ggc cag gtg ctg gag   144
cag ggc agc cag caa ccc tgg cag ctg atc cag gcc cag atg aac tgg   192
tgg cag gat cag ctc aag ctg atg cag cac acc ctg ctc aaa agc gca   240
ggc cag ccg agc gag ccg gtg atc acc ccg gag cgc agc gat cgc cgc   288
ttc aag gcc gag gcc tgg agc gaa caa ccc atc tat gac tac ctc aag   336
cag tcc tac ctg ctc acc gcc agg cac ctg ctg gcc tcg gtg gat gcc   384
ctg gag ggc gtc ccc cag aag agc cgg gag cgg ctg cgt ttc ttc acc   432
cgc cag tac gtc aac gcc atg gcc ccc agc aac ttc ctg gcc acc aac   480
ccc gag ctg ctc aag ctg acc ctg gag tcc gac ggc cag aac ctg gtg   528
```

3/18

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> *Aeromonas caviae*

<220>

<221> CDS

<222> 1..402

<400> 2

```
atg agc gca caa tcc ctg gaa gta ggc cag aag gcc cgt ctc agc aag   48
cgg ttc ggg gcg gcg gag gta gcc gcc ttc gcc gcg ctc tcg gag gac   96
ttc aac ccc ctg cac ctg gac ccg gcc ttc gcc gcc acc acg gcg ttc  144
gag cgg ccc ata gtc cac ggc atg ctg ctc gcc agc ctc ttc tcc ggg   192
ctg ctg ggc cag cag ttg ccg ggc aag ggg agc atc tat ctg ggt caa   240
agc ctc agc ttc aag ctg ccg gtc ttt gtc ggg gac gag gtg acg gcc   288
gag gtg gag gtg acc gcc ctt cgc gag gac aag ccc atc gcc acc ctg   336
acc acc cgc atc ttc acc caa ggc ggc gcc ctc gcc gtg acg ggg gaa   384
gcc gtg gtc aag ctg cct taa                                     405
```

<210>3

<211>1785

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>1..1785

5/18

ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392
act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440
caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488
tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536
gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584
gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632
gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680
cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728
gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776
gct gct taa 1785

<210>4

<211>405

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>1..405

<400> 4

atg tct gct caa tcc ttg gaa gtt ggt caa aaa gct aga tta tct aaa 48
aga ttc ggt gcc gcc gaa gtt gct gct ttt gct gcc tta tct gaa gat 96
ttc aac cca ttg cac ttg gat cca gct ttt gct gct act acc gcc ttc 144
gaa aga cca atc gtc cat ggt atg ttg tta gct tct tta ttt tcc ggt 192
ttg ttg ggt caa caa ttg cca ggt aaa ggt tct att tat ttg ggt caa 240
tct tta tct ttc aaa ttg cca gtc ttt gtc ggt gat gaa gtt acc gct 288
gaa gtt gaa gtt act gct ttg aga gaa gat aaa cca att gct act ttg 336
act act aga att ttc act caa ggt ggt gct tta gct gtt acc ggt gaa 384

7/18

<210>6

<211>1017

<212>DNA

<213>Candida maltosa

<220>

<223>promoter ALK1p

<400>6

atgcatgaac aggatttaac cccaagaaaa aagtctattt tctattttca caaggaaact 60
ggaaaaacct tttgtgttt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaaa ataaattttg 120
aagatttgac ttgctgatga aaatgctatc agttagctc tagacttgat actagactat 180
gatggcaaca catgggtgtc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240
aaaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattgggtg aaaattggct 300
attttggtta ctttctaatt ggggaaatta attgtttaa attccagttt ttccagagtt 360
aagatttcga ccaattattt ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaaa 420
taataatcga ggtacgttta atacgagata ttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480
ttcattgacg atcagaagct tgattggta ttccagggtc tgtgtggata taaaccaaac 540
aaattatcta gcaactgtgc ctccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaaa 600
atctggataa ataaatcatt catttcacat ttccggta gtataagggt tttaaattt 660
tttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtaa caatgtgctt tgtaacatgc 720
aggggatttt ctccgttgct gttttctcca catgctttta atgtgtaata aattaaaaaa 780
attacaaaga aaaaccggca tataagcatc ggagtttaca ttgttaacta actgcaaaat 840
ggcgaatgtt caaatcaaca aaatttaaaa aaaccccaaa aaaaaagtat catataaatt 900
aaactcaaaa tcctttgat tgcataaaat tttaaattct ctcttttt ttcttttta 960
cttcttatc tattctattc ttttttata tatctaattc atttataca tctggtc 1017

<210>7

9/18

<220>

<223> primer

<400> 9

ggacacatat gcgtccagta ttgtaaaata cgagc

35

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

tccccgcggc tgcagcggcg agaccgggtc tgg

33

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

ggacacatat gagccaacca tcttatggcc c

31

<210> 12

11/18

<400> 14

ggggtacctt aaggcagctt gaccacggc

29

<210>15

<211>46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>15

ttttcagct ggagctcgtc gacatgcatg aacaggattt aatccc

46

<210>16

<211>39

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>primer

<400>16

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aattagata

39

<210>17

<211>32

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

13/18

ctgtctgact cgtcattgcc gccttggag tacgactcca actatgagtg tgcttggatc 120
actttgacga tacattcttc gtggaggct gtgggtctga cagctgcgtt ttcggcgagg 180
ttggccgaca acaatatcag ctgcaacgtc attgctggct ttcatcatga tcacattttt 240
gtcggcaaag gcgacgccca gagagccatt gacgttcttt ctaatttggga ccgatagccg 300
tatagtccag tctatctata agttcaact actcgtaact attaccataa catatacttc 360
actgccccag ataagggtcc gataaaaagt tctgcagact aaatttattt cagtctctc 420
ttcaccacca aaatgccctc ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc cgccttggcc 480
gctcgagtgc tcaagctcgt ggcagccaag aaaaccaacc tgtgtgcttc tctggatgtt 540
accaccacca aggagctcat tgagcttgcc gataaggctg gaccttatgt gtgcatgac 600
aagaccata tcgacatcat tgacgacttc acctacgccg gactgtgct cccctcaag 660
gaacttgctc ttaagcacgg ttcttctctg ttgaggaca gaaagtgcg agataatggc 720
aacactgtca agcaccagta caagaacggt gtctaccgaa tcgccgagtg gtccgatac 780
accaacgccc acgggtgacc cggaaccgga atcattgctg gctgcgagc tggcgccgag 840
gaaactgtct ctgaacagaa gaaggaggac gtctctgact acgagaactc ccagtacaag 900
gagttcctgg tccccctcc caacgagaag ctggccagag gtctgctcat gctggccgag 960
ctgtcttga agggctctct ggccactggc gactactcca agcagaccat tgagcttgcc 1020
cgatccgacc ccgagtttgt ggttggcttc attgccaga accgacctaa gggcgactct 1080
gaggactggc ttattctgac cccgggggtg ggtcttgacg acaagggaga cgctctcgga 1140
cagcagtacc gaactgttga ggaatgcatg tctaccgaa cggatatcat aattgtcggc 1200
cgaggtctgt acggccagaa ccgagatcct attgaggagg ccaagcgata ccagaaggct 1260
ggctgggagg ctaccagaa gattaactgt tagaggtag actatggata tgcatttaa 1320
ctgtgtatat agagagcgtg caagtatgga gcgctgttc agcttgtatg atggtcagac 1380
gacctgtctg atcgagtatg tatgatactg cacaacctgt gtatccgat gatctgtcca 1440
atggggcatg ttgttgtt tctcgatacg gagatgctgg gtacaagtag ctaatacgat 1500
tgaactact atacttata gaggttgaa gaaagctgac ttgtgtatga ctattctca 1560
actacatccc cagtcacaat accaccactg cactaccact acacaaaac catgatcaa 1620
ccacccatgg acttcttga ggcagaagaa ctgttatgg aaaagctcaa gagagagaag 1680
ccaagatact atcaagacat gtgtcgcaac ttcaaggagg accaagctct gtacaccgag 1740
aaacaggcta gctcgtcgtt ttcaggaact gttcgatggt tcggagagag tcgccgccca 1800

15/18

aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgcctctc ctaggcaatt aacagatagt 3600
ttgccgggtga taattctctt aacctccac actcctttga cataacgatt tatgtaacga 3660
aacigaaatt tgaccagata ttgttgtaa tagaaaatct ggcttgtagg tggcaaaatc 3720
ccgtctttgt tcatcaattc cctctgtgac tactcgtcat ccctttatgt tgcactgtcg 3780
tatttcttat ttccataca tatgcaagt agatgccgt gtctcctcg ctactgact 3840
cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac 3900
ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 3960
aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgccccctg 4020
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa 4080
gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc 4140
ttaccggata cctgtcggcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac 4200
gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttogctcaa gctgggctgt gtgcacgaac 4260
ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg 4320
taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgagg 4380
atgtaggcgg tgctacagag ttctgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 4440
cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 4500
cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcgggtggtt tttgtttgc aagcagcaga 4560
ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttctacg gggctgacg 4620
ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga tttggctat gagattatca aaaaggatct 4680
tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gtttaaact aatctaaagt atatatgagt 4740
aaacttggc tgacagttac caatgctta tcaagtggc acctatctca gcgatctgc 4800
tattcgttc atccatagt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 4860
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag 4920
atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt 4980
tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag 5040
ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt 5100
ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 5160
tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagttgg 5220
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat 5280

17/18

<223>Adel

<400>21

gatcccttc tcaaacctt taaatgacat tgttcggtt ctctatgtt ggtatcggt 60
cttctcttc tcaaaaaa aggggggcac tattcaaaa aaaatattat aacagtatga 120
tttttccc tctcccgctg attgaggtt tttttctc ttcgtctg gtctttgct 180
tttactcca aaaatggaaa cacgcgoggc tcaactcgaa atccgtgac aaaaaataa 240
aggctgtgag ttctgagcca ataattatga attagtggta ttttttaa agataaataa 300
tcaagaatcg cattagggag acgaatatgc gttattcaaa taaaagaca attcttttag 360
ggtagcatt ccttcaagt tcatccaca tgtacattaa tgtcaatgat gtgcagaag 420
ttaaattagc agaagaaaa aaaatgtga attactcga gtcaactctt cttctctc 480
ttcttttct tctttatcac cataatcac accaccacca ccaccaccag ctcccagatg 540
acttcaacta acttagaagg aacttccca ttgattgcca aaggtaaagt cagagatatt 600
taccaagtg acgacaacac tctttattc gttgctactg atagaattc cgcatacga 660
gtgattatgt ctaatggtat ccaaataaa ggtaaatct taaccaaatt gtctgaattc 720
tggttgatt tcttgccat tgaaccat ttaatcaag gagacattt caaaaatat 780
cctcaactag aaccatatag aaaccaattg gaaggcagat cttacttgt tagaaaattg 840
aaattgatcc ctctgaagt tattgttaga ggttacatca cgggtccgg ctggaaagaa 900
taccaaaaat ctaaaaccgt ccacggtatt cctattgggt atgtgggtga atcacaaca 960
atcactccta tcttaccacc atccactaaa gcagaacaag gtgaacatga tgaaaatac 1020
accaagaac aagctgaca gattgttga aaagaattat gtgatagaat tgaaaaatt 1080
gctattgatt gtacaccaa agccagagat tacgtgcca ctaaaggaat tattatcgct 1140
gatactaat tgaatttg tttagatgt gacaacatcg tcttgtga cgaagtta 1200
actccagatt ctccagatt ctggaatgct gctaaatag aagttggtaa atcicaagac 1260
tcttacgata acaatttt gagagattgg ttaacttcta atggtgtgc tggtaaagat 1320
gggttgcta tgcctgaaga cattgtcact gaaaccaaga gcaaatcgt tgaagctac 1380
gaaaatttaa ctggtgaca atggcaagaa taaattaagg atatctat taaagctt 1440
ctattatcc caactttcg tagtatttc tgacatgtc agatgtttt actttatct 1500
tctgaaatt ttgatttct aaccgactct tgcatgtag tcttgataat gcaacatatg 1560

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/52, C12N 1/19, C12P 7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS/BIOSIS/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-108682 A (Rikagaku Kenkyusho), 28 April, 1998 (28.04.98), & EP 824148 A2 & US 5981257 A	1-23
X Y	Timothy A. Leaf et al., "Sarccharomyces cerevisiae expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate", Microbiology, (1996), Vol.142, No.5, pages 1169 to 1180	1 2-23
X Y	Toshiaki Fukui et al., "Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escherichia coli, FEMS Microbiology Letters, (1999), Vol.170, No.1, pages 69 to 75	1 2-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 August, 2001 (08.08.01)Date of mailing of the international search report
21 August, 2001 (21.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Toshiaki Fukui et. al, Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escehrichia coli. FEMS Microbiolgy Letters, 1999, Vol.170, No.1, p.69-75	<u>1</u> 2 - 23